昆虫 RNA 沉默抗病毒机制研究进展

吴　萍[1,2]，郭锡杰[1,2,*]，周加春[3]
(1. 江苏科技大学，江苏镇江 212018；2. 中国农业科学院蚕业研究所，江苏镇江 212018；
3. 盐城市农业科学研究院，江苏盐城 224000)

摘要：RNA 沉默是昆虫用来抵御病毒入侵的一种普遍而又进化保守的防御机制，而昆虫病毒也会相应地编码沉默抑制子来破坏宿主的防御功能。本文主要结合果蝇的相关研究成果对昆虫 RNA 沉默抗病毒机制、RNA 沉默抑制子的作用特征及宿主与病毒的共进化关系做一综述。研究表明，由小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNA)介导的 RNA 干扰在果蝇抗病毒防御机制中发挥重要作用。果蝇中 Dicer-2(Dcr-2)，argonaute-2(AGO2)和双链 RNA 结合蛋白 R2D2 是 siRNA 干扰途径中的 3 个关键组分，这 3 个基因的缺失或突变会显著提高果蝇对 RNA 病毒的感受性。此外，果蝇中还鉴定了其他与 RNA 干扰密切相关的基因，如 *vasa intronic gene*, *aubergine*, *armitage*, *rm62* 和 *piwi*，它们在抗病毒感染中同样发挥重要作用。果蝇病毒中已鉴定出 3 种 RNA 沉默病毒抑制子(viral suppressors of RNAi, VSRs)，分别为果蝇 FHV 病毒沉默抑制子 FHV-B2、果蝇 C 病毒沉默抑制子 DCV-1A 及果蝇 CrPV 病毒沉默抑制子 CrPV-1A。FHV-B2 和 DCV-1A 通过与 dsRNA 或 siRNA 结合抑制 RNA 沉默，而 CrPV-1A 通过与 AGO2 结合阻止 RISC 的形成抑制 RNA 沉默。在漫长的进化过程中，病毒和宿主相互博弈，协同进化。昆虫抗病毒沉默途径中的关键组分通过保持持续和快速进化来对抗高度变异的 VSRs。

关键词：昆虫；RNA 干扰；抗病毒机制；RNA 沉默抑制子；共进化
中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)08-0927-06

Advances in the mechanism of antiviral RNA silencing in insects

WU Ping[1,2], GUO Xi-Jie[1,2,*], ZHOU Jia-Chun[3] (1. Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China; 2. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China; 3. Yancheng Academy of Agricultural Sciences, Yancheng, Jiangsu 224000, China)

Abstract: RNA silencing is identified as a general and evolutionarily conserved antiviral defense mechanism in insects. Meanwhile, viruses adapt the strategy by encoding suppressors of RNA silencing to counter the host-defense. Based on the related achievements in *Drosophila*, this article reviews the mechanism of antiviral RNA silencing, the characteristics and functions of RNA silencing suppressors, and the coevolution between hosts and viruses. Studies showed that RNA interference mediated by siRNA (small interfering RNAs, siRNA) plays a vital role in antiviral defense in *Drosophila*. Dicer-2(Dcr-2), argonaute-2 (AGO2) and R2D2 are three key components in siRNA pathway in *Drosophila*. Flies with these three genes knockdowned were hypersensitive to RNA virus infection. Additionally, several core genes involved in RNA interference were identified, including *vasa intronic gene*, *aubergine*, *armitage*, *rm62* and *piwi*, which also play roles in antiviral defense in *Drosophila*. Three viral suppressors of RNAi (VSRs) have been identified in *Drosophila* viruses, *i.e.*, FHV-B2, DCV-1A and CrPV-1A. FHV-B2 and DCV-1A inhibit RNA silencing by binding dsRNA or siRNA while CrPV-1A by targeting AGO2. During the boundless process of evolution, the hosts and viruses counter each other as well as coevolve. Components of antiviral silencing against highly diverse VSRs should be continuously and rapidly evolving.

Key words: Insect; RNA interference; antiviral mechanism; suppressors of RNA silencing; coevolution

RNA 沉默现象是 1990 年在转基因矮牵牛花 *Petunia hyhrida Vilm* 中首次发现的(Napoli *et al*., 1990)。Jorgensen 研究小组试图通过过量表达查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)基因得到颜色更

基金项目：国家自然科学基金项目(30972143)；江苏省自然科学基金项目(BK2010353)；江苏科技大学引进人才科研启动项目(35181001)
作者简介：吴萍，女，1978 年生，江苏镇江人，助理研究员，博士研究生，研究方向为昆虫分子病理，E-mail：wp4114@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：guoxijie@126.com
收稿日期 Received：2011-03-02；接受日期 Accepted：2011-06-25

深的矮牵牛花，结果意外得到了白色和白紫相间的矮牵牛花，且过量表达 CHS 的矮牵牛花中 CHS 的表达水平比正常矮牵牛花中的表达水平低 50 倍，推测外源导入的 CHS 同时抑制了内源 CHS 的表达。当时将这种现象称为“共抑制（co-suppression)”。Fire 等（1998）在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中进行反义 RNA 抑制实验时发现，注入双链 RNA 诱发了比单独注射正义或反义 RNA 要强得多的基因沉默，推测在双链 RNA 引导的抑制过程中存在某种扩增效应，并且将这种现象命名为 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)。随后的研究发现，RNA 干扰现象不仅存在于植物和真菌中，还广泛存在于昆虫中，如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、天蚕 *Hyalophora cecropia*、西方蜜蜂 *Apis mellifera* 等（Kennerdell and Carthew, 1998; Levashina *et al.*, 2001; Adelman *et al.*, 2002; Bettencourt *et al.*, 2002)。

RNA 干扰作为一种先天的抵抗病毒感染的防御机制最早是在植物中发现的（Lindbo *et al.*, 1993)。研究发现，转基因植物中，与病毒基因组 RNA 同源的序列可特异性抑制病毒的表达，在植物中诱导产生特定病毒的免疫反应。之后，在昆虫中也证实存在 RNA 沉默抗病毒感染机制。Beye 等(2002)研究发现果蝇的 S2 细胞可通过 RNA 沉默来抑制兽棚病毒(flock house virus, FHV)的感染。在蚊子的细胞或成体中表达登革病毒(dengue virus)基因组片断可抑制登革病毒的感染和复制（Gaines *et al.*, 1996)。本文结合果蝇等昆虫近几年在 RNA 沉默抗病毒感染方面的研究成果对昆虫 RNA 沉默抗病毒机制的研究进展做一综述。

1 果蝇 RNA 沉默机制

RNA 沉默依赖于 21 ~ 30 个核苷酸长度的小 RNA 分子，可分为 3 个类型：小干扰 RNA（small interfering RNAs, siRNA)、微小 RNA（microRNAs, miRNA)及 Piwi 相关的干扰 RNA（Piwi-associated interfering RNAs, piRNAs)。

果蝇中 Dicer-2(Dcr-2), argonaute-2(AGO2)和双链 RNA 结合蛋白 R2D2 是 siRNA 介导的 RNA 干扰途径中的 3 个关键组分。Dcr-2 属 RNaseⅢ基因家族，其 N 端含有 1 个 RNA 解旋酶结构域，在 C 末端含有 2 个 RNaseⅢ结构域和 1 个双链 RNA 结合结构域(double-stranded RNA binding domain, dsRBD)(MacRae *et al.*, 2006)。Dcr-2 可特异性识别病毒的 dsRNA 并将其切割成 21 ~ 25 bp 的 siRNA。随后，siRNA 解链和 siRNA 中的反义链在 R2D2 的介导下结合形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)(Schwarz *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003)。RISC 中的关键组分 AGO2 属 Argonaute 家族，含有 RNase H 活性，可特异性切割与其中 siRNA 具有完全互补序列的病毒靶 mRNA。在 RNA 聚合酶的作用下，以 siRNA 为引物，mRNA 为模板，合成更多的双链 RNA，从而进一步扩大这种降解作用(Ding and Voinnet, 2007; Marques and Carthew, 2007)。

果蝇基因组还可编码 Dicer-1（Dcr-1)。Dcr-1 通过切割 miRNA 前体(microRNA precursors)产生 22 nt 的 miRNA 来调节内源基因的表达，参与果蝇正常生命活动。Dcr-1 和另两种关键组分 R3D1 及 argonaute-1（AGO1)一起参与了 miRNA 介导的基因沉默(Jiang *et al.*, 2005)。此外，果蝇还存在第三种经 piRNA 介导的抑制内源性逆转录酶病毒的沉默途径，参与该途径的其他重要蛋白有 Piwi, Aubergine（Aub）和 argonaute-3（AGO3)，均为 Argonaute 家族成员。piRNA 介导的沉默途径与 Dicer 酶家族无关(Aravin *et al.*, 2007; O'Donnell and Boeke, 2007)。

2 果蝇 RNA 沉默抗病毒机制

果蝇中，发挥抗病毒感染作用的 RNA 沉默主要依赖于 siRNA 介导的 siRNA 干扰途径。研究表明，在感染病毒的果蝇细胞中可检测到大量的来源于病毒的 ViRNAs（virus-derived siRNAs, ViRNAs)，ViRNAs 仅与 siRNA 干扰途径中的关键组分 AGO2 发生免疫共沉淀，而与涉及 miRNA 途径的 AGO1 无免疫共沉淀现象。此外，在感染 FHV 的 Dcr-2 缺陷型果蝇胚胎中检测不到 ViRNAs(Aliyari *et al.*, 2008; Czech *et al.*, 2008)。为进一步证实 siRNA 干扰是否在抗病毒感染的过程中发挥重要作用，研究者一般采取敲除或突变 RNA 沉默途径中关键基因的策略来进行验证。研究发现，Dcr-2 在 4 种不同的(+)ssRNA 病毒：果蝇 C 病毒(*Drosophila* C virus, DCV)、蟋蟀麻痹病毒(cricket paralysis virus, CrPV)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus, SINV)以及 FHV 的免疫机制中均发挥作用(Galiana-Arnoux *et al.*, 2006; van Rij *et al.*,2006; Wang *et al.*, 2006)。Wang 等(2006)将纯化的 FHV 病毒粒子注入野生型和 Dcr-2 缺陷型果蝇中，结果表明，50% 的野生

型果蝇在感染 15 d 后依然能够存活；而 Dcr-2 缺陷型果蝇中，60% 的果蝇在感染 6 d 后死亡，95% 的果蝇在感染 15 d 后死亡，表明 Dcr-2 缺陷型果蝇对 FHV 的感受性显著提高。然而，Zambon 等(2006)对果蝇 X 病毒(*Drosophila* X virus，DXV)的研究却发现，这种 dsRNA 病毒不受 Dcr-2 突变的影响，推测它可能受到 Dcr-1 或涉及到 piRNA 生物合成的相关核酸酶的影响。R2D2 含有一个串联的 dsRNA 结合功能域，与 Dcr-2 在体内形成杂合二聚体，在 siRNA 装载入 RISC 时发挥作用(Liu *et al*., 2003)。果蝇敲除 *r2d2* 基因后，FHV 的滴度显著上升(Wang *et al*., 2006)，对果蝇 DXV 的感受性也显著提高($P \leqslant 0.001$)(Zambon *et al*., 2006)。Ago-2 缺陷型果蝇对 DCV，DXV 以及 CrPV 的感受性显著增强($P \leqslant 0.001$)，病毒 RNA 的表达量及对果蝇的致死率均显著提高且宿主细胞抗病毒免疫反应的强弱与 AGO2 表达量的多少密切相关(van Rij *et al*., 2006；Zambon *et al*., 2006)。

Zambon 等(2006)还鉴定了其他与 RNA 沉默密切相关的基因如 *vasa intronic gene*，*aubergine*，*piwi*，*armitage* 和 *rm62*。这些基因发生突变后，同样会显著提高果蝇对 DXV 的感受性($P \leqslant 0.001$)。*vasa intronic gene*，*aubergine* 和 *piwi* 基因均属 Argonaute 基因家族。*vasa intronic gene* (VIG)在 RNA 沉默中发挥重要作用，也被称之为 PAZ-Piwi-Domain (PPD)蛋白，它们都具有一个 PAZ 功能域和 C 末端的 Piwi 功能域，这些功能域在蛋白之间的互作中发挥作用(Cerutti *et al*., 2000)。果蝇缺失 *vig* 基因后，对 DXV 的感受性会大大加强；abergine 与卵母细胞的 RNA 沉默密切相关(Kennerdell *et al*., 2002；Findley *et al*., 2003)；*piwi* 可控制雄性干细胞分裂并与转录后基因沉默相关(Pal-Bhadra *et al*., 2002)；*armitage* 的突变会使 RISC 的装配受损，是 RNA 沉默所必须的(Cook *et al*., 2004；Tomari *et al*., 2004)；*rm62* 与人类 *p68* 同源，对于 RNA 沉默功能同样是必须的(Ishizuka *et al*., 2002)。

Sabin 等(2009)使用果蝇 RNA 沉默文库筛选 RNA 病毒(FHV，DCV，CrPV，SINV)感染的应答分子，研究发现 Ars2(CG7843)是果蝇抗病毒感染的一个重要的免疫因子，缺失 Ars2 会提高果蝇对 RNA 病毒的感受性；Ars2 可通过与 Dcr-2 的互作来调控其在体外的活性，是 siRNA 介导的 RNA 沉默途径中的一个重要组分，进一步研究发现，它在 miRNA 介导的沉默途径中也发挥着重要作用。

值得一提的是，RNA 沉默并不能彻底清除病毒的感染只是减缓病毒的复制，为宿主启动其他免疫机制提供充足的时间(Zambon *et al*., 2006)。免疫体系的有效性依赖于病毒特异性免疫信号的系统性扩散。研究发现，siRNA 为可移动的信号分子，因为它们数量丰富，足够诱导体内产生 RNA 沉默，另外，siRNA 长度适中，不仅能代表序列特异性，较小的分子量又能够方便进行细胞间的传递，且始终与 RNA 沉默密切相关，能够直接启动 RNA 沉默(Attarzadeh-Yazdi *et al*., 2009)。dsRNA 的摄入通路对 RNA 沉默抗病毒感染机制是必需的，这一通路的受损会导致果蝇对 DCV 和 SINV 的高度易感性(提高 $10^2 \sim 10^5$ 倍)(Saleh *et al*., 2009)。

3　RNA 沉默抑制子

病毒在长期的进化过程中，为了逃避或抑制宿主的 RNA 沉默防御机制，能够编码一些具有沉默抑制功能的蛋白质，称为 RNA 沉默病毒抑制子(viral suppressors of RNAi，VSRs)。从结构蛋白和非结构蛋白中鉴定出来的具有抑制子功能的蛋白包括病毒的许多功能蛋白，如运动蛋白、病毒复制酶、复制增强子及转录激活因子等。第一个鉴定得到的 RNA 沉默抑制子是马铃薯 Y 病毒属 *Potyvinases* 病毒编码的 P1/HC-Pro 蛋白(Kasschau *et al*., 1997)。研究发现，植物中，约有超过 35 种 VSRs，在动物中，也发现了约 10 种 VSRs(Li and Ding，2005；Ding and Voinnet，2007)。

不同病毒的 RNA 沉默抑制子的氨基酸序列和蛋白质结构是不同的，其作用时间和方式也不同，不同抑制子能够针对 RNA 沉默的不同阶段根据不同需要而起作用(孙燕霞和刘红梅，2008)。有些 VSRs 通过与 siRNA 结合来阻止 RISC 的形成从而抑制 RNAi。如番茄丛矮病毒(tomato bushy stunt virus，TBSV)编码的 P19 蛋白具有双链小 RNA 结合活性，通过形成 P19-siRNA 复合物减少细胞内游离的 siRNA，并使结合态的 siRNA 不能或减少与 RISC 结合，从而达到抑制基因沉默的目的(赵爽等，2007)。十字花科感染烟草花叶病毒(crucifer-infecting tobacco mosaic virus，Cr-TMV)编码的 p122 蛋白，可与 21 nt 的 siRNA 以及 miRNA 3′粘末端的 2 nt 核苷酸结合阻止其装配形成 RISC 复合体(Csorba *et al*., 2007)；有些 VSRs 可直接与 RISC 的关键组分结合抑制其活性从而阻断 RNA 沉默途径。如甘薯轻斑驳花叶病毒(sweet potato mild mottle

virus, SPMMV)编码的 P1 蛋白可攻击 RISC 复合体中的 AGO1, P1 蛋白 N 端的 3 个 WG/GW 保守域，对于结合和抑制 AGO1 的活性是必需的(Giner *et al.*, 2010)；还有一些 VSRs 可作为核转录因子，诱导表达与宿主中 RNA 沉默正调节因子同源的蛋白因子，从而降低 RNA 沉默效应。如双粒病毒(geminivirus)产生的 TrAP 因子具有核定位和结合 DNA 功能，可诱导 30 多个宿主基因的过量表达，其中包括与 RNA 沉默的正调节因子 WEX 同源的 WEL-1 蛋白因子，由于 WEL-1 与 WEX 竞争结合正调节 RNA 沉默功能所需的核因子，从而降低 WEX 对 RNA 沉默的正调节作用。此外，TrAP 转录活化的其他蛋白质因子也可直接抑制 RISC 活性从而阻断 RNA 沉默途径(张义玲等, 2007)。

来源于不同动植物病毒的 VSRs 具有交叉抑制的特性。来源于动物病毒的沉默抑制子，如 FHV 的 B2、流感病毒的 NS1、牛痘病毒的 E3L 等均能有效抑制植物细胞中的 RNA 沉默。一些植物病毒起源的沉默抑制子如来源于烟草环斑病毒(tobacco ringspot virus, TRSV)的 P19，芜菁缩叶病毒(turnip curl virus, TCV)的 CP 以及花生丛簇病毒(peanut clump virus, PCV)的 P15 等在动物细胞中也能正常发挥抑制子功能，推断抑制子在各自途径中是针对一些保守的单元起作用，如 dsRNA 结合域和 PAZ 结构域(孙燕霞和刘红梅, 2008)。

果蝇病毒中已鉴定出 3 种 VSRs，分别为果蝇 FHV 病毒沉默抑制子 FHV-B2、果蝇 C 病毒沉默抑制子 DCV-1A 及果蝇 CrPV 病毒沉默抑制子 CrPV-1A。目前对果蝇 FHV-B2 的研究较为深入，FHV-B2 蛋白为同型二聚体，每个单体含有 3 个 α 螺旋，α 螺旋的反向平行可延长与 dsRNA 的结合界面(Lingel *et al.*, 2005)。FHV 感染果蝇后，FHV 正链 RNA 基因组在 5′端产生一个约 400 bp 长的 dsRNA 片断，Dcr-2 将其切割产生 siRNA 与 AGO2 进行装配并在 3′端被甲基化。FHV-B2 可通过与长的 dsRNA 以及 siRNA 结合来阻止 RISC 的形成(Aliyari *et al.*, 2008)。此外，FHV-B2 的 C 末端还可与 Dcr-2 的 PAZ 功能域结合抑制 siRNA 的生物合成(Singh *et al.*, 2009)。果蝇 DCV-1A 与 CrPV-1A 属同一家族，两者的序列也有很多相似之处，但其作用方式却不同。DCV-1A 含有一个 *bona fide* dsRNA 结合域，只能与长的 dsRNA 结合阻止 RISC 的形成。而 CrPV-1A 通过与 AGO2 结合抑制其活性进而阻止 RISC 的形成，并不影响 miRNA 中相关的 AGO1 的活性(Nayak *et al.*, 2010)。在伊蚊 *Aedes albopictus* 中也已证实 B2 蛋白可抑制 RNA 沉默途径(Cirimotich *et al.*, 2009)。

4 病毒与宿主基因组的共进化

在漫长的进化过程中，病毒和宿主二者相互博弈，协同进化，发展成为非常重要的防御和反防御机制。一方面，宿主不断完善 RNA 沉默机制抵抗病毒以及外来核酸的入侵；另一方面，病毒为了生存繁殖，通过不同方式的序列变化(如突变、重组、自然选择、基因漂流或迁移等)来应对宿主的防御反应，进行反防御(赵爽等, 2007)。ssRNA 或 dsRNA 病毒在感染宿主细胞后，其基因组 RNA 通过宿主编码产生的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)进行复制，然而由于 RdRP 缺乏核苷酸校对功能，导致基因组发生高频率的突变，致使 RNA 病毒在 siRNA 选择压力下，通过 siRNA 靶区域的碱基突变而逃避 RNA 沉默。此外，病毒还可编码沉默抑制子来抵制宿主细胞特异性降解病毒靶序列。反过来，宿主细胞为了抵抗这种强大的沉默抑制作用又进一步进化产生了新的抗病毒机制，如在普通烟草 *Nicotiana tabacum* 中能诱导产生一种强烈的“基因对基因”(gene-for-gene)的寄主超敏反应，从而大大降低了烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)的病毒症状(王献兵等, 2005)。植物和昆虫抗病毒沉默途径中的关键组分由于受到高度变异的 VSRs 的挑战，它们也需要保持持续和快速的进化。果蝇的 Dcr-2, R2D2 和 AGO2 的进化率比其 miRNA 途径中的 Dcr-1, R3D1 和 AGO1 要快 3%(Ding and Voinnet, 2007)。

在无脊椎动物、植物，甚至原核生物中，RNA 沉默作为一种古老的病毒防御机制发挥重要作用，但在脊椎动物中，为何这一防御机制丢失，取而代之的是干扰素诱导的应答免疫机制？最近，有研究表明，果蝇感染 C 病毒会在脂肪体中诱导表达一个编码小的富含半胱氨酸的多肽基因 *vago*, *vago* 的表达上调可抑制果蝇脂肪体中 DCV 的增殖。*vago* 的诱导表达与 Dcr-2 密切相关。*vago* 在果蝇感染 SINV 时也会被诱导表达，但对 FHV 无影响，可能受 FHV-B2 的抑制作用(Deddouche *et al.*, 2008)。研究表明 FHV-B2 只能和 dsRNA 结合不能和 ssRNA 及 DNA 结合(Kemp and Imler, 2009)，说明 dsRNA 可能是一个重要的被果蝇先天免疫机制所识别的分子模式(molecular pattern)。FHV-B2 可抑制 Dcr-2

的活性，在 Dcr-2 缺陷型果蝇中，*vago* 不被诱导表达。Dcr-2 含有一个 DExD/H box 解旋酶功能域，该功能域对 *vago* 的诱导表达非常重要。有趣的是，Dcr-2 的 DExD/H box 解旋酶功能域与诱导干扰素基因表达的人类 RIG-I 类受体家族的解旋酶功能域同源，提示 Dcr-2 在果蝇的抗病毒免疫中可能具有双重作用：一方面作为 RNAi 的重要组分；另一方面诱导识别病毒 dsRNAs 启动 RNA 沉默抗病毒程序(Deddouche *et al*., 2008)。

5 结语和展望

昆虫与其他无脊椎动物一样，不具备高等动物完善的免疫体系，缺乏特异的抗原抗体反应，但昆虫在长期进化过程中，具有独特的先天免疫系统和免疫机制从而可以保护自身免受外源物侵害。RNA 沉默作为一种先天的、进化保守的抗病毒免疫机制可从 3 方面得以佐证：(1)RNAi 途径中的关键基因发生突变，会提高宿主细胞对 RNA 病毒的感受性；(2)病毒感染过程中，来源于病毒的 siRNAs 会在感染细胞中大量积累；(3)病毒自身可编码 RNAi 沉默抑制子来抵制宿主细胞的 RNAi 免疫机制。利用基因沉默机制，减少或消除病毒侵染、增殖必需的关键基因的表达抑制病毒的复制，为病毒病的治疗提供了一个全新的手段。但病毒沉默抑制子的存在对以 RNA 沉默为基础的病毒病治疗是一个挑战。目前，昆虫上取得的相关研究成果主要集中在果蝇上，也只有少数几个 RNA 沉默抑制因子得到鉴定，一些与 siRNA 的传送、特异性和有效性等相关问题尚不明确。对 RNA 沉默抑制子的研究可为进一步揭示病毒与宿主的相互关系，培育抗病毒品种提供极大的参考价值。

参 考 文 献 (References)

Adelman ZN, Sanchez-Vargas I, Travanty EA, Carlson JO, Beaty BJ, Blair CD, Olson KE, 2002. RNA silencing of dengue virus type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted-repeat RNA derived from the virus genome. *J. Virol*., 76: 12925 - 12933.

Aliyari R, Wu Q, Li HW, Wang XH, Li F, Green LD, Han CS, Li WX, Ding SW, 2008. Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by small RNAs in *Drosophila*. *Cell Host & Microbe*, 4(4): 387 - 397.

Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J, 2007. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*, 318: 761 - 764.

Attarzadeh-Yazdi G, Fragkoudis R, Chi Y, Siu RW, ülper L, Barry G, Rodriguez-Andres J, Nash AA, Bouloy M, Merits A, Fazakerley JK, Kohl A, 2009. Cell-to-cell spread of the RNA interference response suppresses Semliki Forest virus (SFV) infection of mosquito cell cultures and cannot be antagonized by SFV. *J. Virol*., 83: 5735 - 5748.

Bettencourt R, Terenius O, Faye I, 2002. *Hemolin* gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Insect Mol. Biol*., 11: 267 - 271.

Beye M, Härtel S, Hagen A, Hasselmann M, Omholt SW, 2002. Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Mol. Biol*., 11: 527 - 532.

Cerutti L, Mian N, Bateman A, 2000. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci*., 25: 481 - 482.

Cirimotich CM, Scott JC, Phillips AT, Geiss BJ, Olson KE, 2009. Suppression of RNA interference increases alphavirus replication and virus-associated mortality in *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol*., 9: 49.

Cook HA, Koppetsch BS, Wu J, Theurkauf WE, 2004. The *Drosophila* SDE3 homolog armitage is required for oskar mRNA silencing and embryonic axis specification. *Cell*, 116: 817 - 829.

Csorba T, Bovi A, Dalmay T, Burgyán J, 2007. The p122 subunit of *Tobacco Mosaic Virus* replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J. Virol*., 81(21): 11768 - 11780.

Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingeheyde C, Dus M, Perrimon N, Kellis M, Wohlschlegel JA, Sachidanandam R, Hannon GJ, Brennecke J, 2008. An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*, 453(7196): 798 - 802.

Deddouche S, Matt N, Budd A, Mueller S, Kem PC, Galiana-Arnoux D, Dostert C, Antoniewski C, Hoffmann JA, Imler JL, 2008. The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *Drosophila*. *Nat. Immunol*., 9: 1425 - 1432.

Ding SW, Voinnet O, 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130: 413 - 426.

Findley SD, Tamanaha M, Clegg NJ, Ruohola-Baker H, 2003. *Maelstrom*, a *Drosophila spindle*-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1 homolog, Aubergine, in nuage. *Development*, 130: 859 - 871.

Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806 - 811.

Gaines PJ, Olson KE, Higgs S, Powers AM, Beaty BJ, Blair CD, 1996. Pathogen-derived resistance to dengue type 2 virus in mosquito cells by expression of the premembrane coding region of the viral genome. *J. Virol*., 70: 2131 - 2137.

Galiana-Arnoux D, Dostert C, Schneemann A, Hoffmann JA, Imler JL, 2006. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nat. Immunol*., 7: 590 - 597.

Giner A, Lakatos L, García-Chapa M, López-Moya JJ, Burgyán J, 2010. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog*., 6(7): e1000996.

Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H, 2002. A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.*, 16: 2497 – 2508.

Jiang F, Ye X, Liu X, Fincher L, McKearin D, Liu Q, 2005. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 19(14): 1674 – 1679.

Kasschau KD, Cronin S, Carrington JC, 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology*, 228(2): 251 – 262.

Kem PC, Imler JL, 2009. Antiviral immunity in *Drosophila*. *Curr. Opin. Immunol.*, 21(1): 3 – 9.

Kennerdell JR, Carthew RW, 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell*, 95: 1017 – 1026.

Kennerdell JR, Yamaguchi S, Carthew RW, 2002. RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on *aubergine* and *spindle-E*. *Genes Dev.*, 16: 1884 – 1889.

Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC, 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, 104: 709 – 718.

Li HW, Ding SW, 2005. Antiviral silencing in animals. *FEBS Lett.*, 579 (26): 5965 – 5973.

Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG, 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell*, 5: 1749 – 1759.

Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M, 2005. The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Rep.*, 6(12): 1149 – 1155.

Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, Wang X, 2003. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, 301: 1921 – 1925.

MacRae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA, 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by dicer. *Science*, 311: 195 – 198.

Marques JT, Carthew RW, 2007. A call to arms: coevolution of animal viruses and host innate immune responses. *Trends Genet.*, 23: 359 – 364.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R, 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell*, 2(4): 279 – 289.

Nayak A, Berry B, Tassetto M, Kunitomi M, Acevedo A, Deng C, Krutchinsky A, Gross J, Antoniewski C, Andino R, 2010. Cricket paralysis virus antagonizes Argonaute 2 to modulate antiviral defense in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17(5): 547 – 554.

O' Donnell KA, Boeke JD, 2007. Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell*, 129: 37 – 44.

Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler JA, 2002. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell*, 9: 315 – 327.

Sabin LR, Zhou R, Gruber JJ, Lukinova N, Bambina S, Berman A, Lau CK, Thompson CB, Cherry S, 2009. Ars2 regulates both miRNA- and siRNA- dependent silencing and suppresses RNA virus infection in *Drosophila*. *Cell*, 138: 340 – 351.

Saleh MC, Tassetto M, van Rij RP, Goic B, Gausson V, Berry B, Jacquier C, Antoniewski C, Andino R, 2009. Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, 458 (7236): 346 – 350.

Schwarz DS, Hutvágner G, Haley B, Zamore PD, 2002. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell*, 10: 537 – 548.

Shun YX, Liu HM, 2008. The characteristics and biotechnological applications of RNA silencing suppressors encoded by viruses. *Shandong Science*, 21: 21 – 24. [孙燕霞, 刘红梅, 2008. 病毒编码的 RNA 沉默抑制子的特征及其生物技术应用. 山东科学, 21: 21 – 24]

Singh G, Popli S, Hari Y, Malhotra P, Mukherjee S, Bhatnagar RK, 2009. Suppression of RNA silencing by Flock house virus B2 protein is mediated through its interaction with the PAZ domain of Dicer. *FASEB J.*, 23(6): 1845 – 1857.

Tomari Y, Du T, Haley B, Schwarz DS, Bennett R, Cook HA, Koppetsch BS, Theurkauf WE, Zamore PD, 2004. RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant *armitage*. *Cell*, 116: 831 – 841.

van Rij RP, Saleh MC, Berry B, Foo C, Houk A, Antoniewski C, Andino R, 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.*, 20: 2985 – 2995.

Wang XB, Zhang LD, Li DW, Han CG, Yu JL, 2005. Approaches of research on RNA silencing suppressors encoded by plant viruses. *Journal of China Agricultural University*, 10(4): 31 – 38. [王献兵, 张凌娣, 李大伟, 韩成贵, 于嘉林, 2005. 植物病毒编码 RNA 沉默抑制子的研究进展. 中国农业大学学报, 10(4): 31 – 38]

Wang XH, Aliyari R, Li WX, Li HW, Kim K, Carthew RW, Atkinson P, Ding SW, 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*, 312: 452 – 454.

Zambon R, Vakharia VN, Wu L, 2006. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cell Microbiol.*, 8: 880 – 889.

Zhang YL, Wei XB, Cai R, Qian C, 2007. Mechanisms of suppression effects of RNA silencing and its application for the field of biomedicine. *Progress in Biochemistry and Biophysiology*, 34(12): 1246 – 1254. [张义玲, 魏旭斌, 蔡荣, 钱程, 2007. 抑制 RNA 沉默现象的机理及其在生物医学领域内的应用. 生物化学与生物物理进展, 34(12): 1246 – 1254]

Zhao S, Wang Q, Li YH, 2007. Molecular mechanism of virus induced gene silencing in plants. *Plant Physiology Communication*, 43(2): 384 – 389. [赵爽, 王琦, 李艳红, 2007. 植物病毒诱导的基因沉默效应的分子机制. 植物生理学通讯, 43(2): 384 – 389]

(责任编辑: 赵利辉)